论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.31.002

人脐带间充质干细胞治疗 POF 大鼠可行性及其机制的实验研究*

张灵俐[1,2],王 婷[2],刘文慧[2],杜 静[1],王 浩[1△]
(1.广东药科大学附属第一医院妇产科,广州 510310;2.广东药科大学公共卫生学院,广州 510310)

[摘要] **目的** 探讨人脐带间充质干细胞(hUCMSCs)治疗卵巢早衰(POF)大鼠可行性及可能机制。**方法** 将 62 只健康 SD 大鼠分为对照组(A 组)、模型组(B 组)和 hUCMSCs 移植组(C 组),B、C 组大鼠腹腔注射环磷酰胺建立化疗药物性大鼠 POF 动物模型,A 组大鼠注射等体积灭菌水,建模成功后,C 组通过尾静脉注射 hUCMSCs 进行治疗。比较各组大鼠血清中雌二醇(E2)、卵泡刺激素(FSH)、黄体生成素(LH)、抑制素 B(INHB)、抗苗勒管激素(AMH)、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 3(caspase-3)水平,以及人 ALU 基因在大鼠卵巢内分布情况,并比较各组大鼠 HE 染色后卵巢组织形态、卵泡数及黄体数。**结果** 建模完成后 1 d,B 组 INHB、AMH 水平低于 A 组;干细胞移植后 17 d,C 组 INHB、AMH 水平升高,卵巢体积增大、生长卵泡增多、闭锁卵泡减少,与 B 组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。卵巢间质、颗粒及卵子细胞中观察到人 ALU 基因,caspase-3 信号表达量[$(4.40\pm1.46)\times10^{-3}$]明显低于 B 组($P<0.05$)。**结论** hUCMSCs 通过修复颗粒细胞和直接合化成颗粒细胞卵子细胞两种途径作用于卵巢,达到治疗 POF 型大鼠作用。

[关键词] 间充质干细胞;卵巢早衰;机制
[中图法分类号] R711.59 [文献标识码] A [文章编号] 1671-8348(2018)31-3968-05

Experimental study on the feasibility and mechanism of human umbilical cord mesenchymal stem cells in the treatment of the premature ovarian failure rats*

ZHANG Lingli[1,2],*WANG Ting*[2],*LIU Wenhui*[2],*DU Jing*[1],*WANG Hao*[1△]
(1.*Department of Gynaecology and Obstetrics*,*the First Affiliated Hospital of Guangdong Pharmaceutical University*,*Guangzhou*,*Guangdong* 510310,*China*;2.*School of Public Health*,*Guangdong Pharmaceutical University*,*Guangzhou*,*Guangdong* 510310,*China*)

[**Abstract**] **Objective** To study the feasibility of human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUCMSCs) in the treatment of rats with premature ovarian failure (POF). **Methods** Sixty-two healthy SD rats were divided into the control group (group A), the model group (group B) and the hUCMSCs transplantation group (group C). Group B and C were injected cyclophosphamide intraperitoneally to establish the model of POF, while group A was injected with the same volume sterilizing water. After successfully modeling, group C was treated by injecting hUCMSCs into caudal vein. Measured the serum levels of estradiol (E2), follicle stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), serum inhibin B (INHB), anti-mullerian hormone (AMH) and cysteine aspartic acid proteas-3 (caspase-3), the distribution of human ALU gene in rat ovary was detected, the changes of ovarian reserve function were analyzed by comparing the morphological changes, the number of follicles and corpus luteum after HE stain. **Results** After one day of modeling, the contents of INHB and AMH in group B were lower than those of group A. After 17 days of stem cell transplantation, INHB, AMH, ovarian volume and growth follicles increased in group C, and atresia follicles decreased, there was statistically significant difference between group B and C ($P<0.05$). Human ALU gene was observed in ovarian stromal cells, small granular cells and oocyte. The expression of caspase-3 [$(4.40\pm1.46)\times10^{-3}$] was lower than group B ($P<0.05$). **Conclusion** hUCMSCs act on the POF rats by repairing granulosa cells and directly synthesizing granulosa cells into oocyte.

[**Key words**] mesenchymal stem cells; premature ovarian failure; mechanics

女性卵巢早衰(premature ovarian failure,POF)一直无十分有效的治疗手段,但间充质干细胞(mesenchymal stem cells,MSC)的快速发展为治疗 POF 开拓了新方向[1]。MSC 主要来源为骨髓、脂肪和脐带,骨髓 MSC 存在人来源水平极低、病毒感染率高、增殖分化潜能随年龄增大下降等风险[2]。人脐带

* **基金项目**:吴阶平医学基金临床科研专项资助基金(320.6755.15006)。 **作者简介**:张灵俐(1993-),在读公共卫生硕士,主要从事妇科疾病诊治及产科方面的研究。 △ **通信作者**,E-mail:wanghaowhzyy@126.com。

MSC(hUCMSCs)取材方便,免疫原性低,对不同程度受损组织有修复作用,可作为目前理想种子源细胞[3]。国内外已有相关研究,但确证性实验证据不足,且改善卵巢储备、生育功能作用机制尚不清楚,临床进展缓慢[4-5]。本实验旨在观察 hUCMSCs 治疗环磷酰胺(CTX)建立 POF 模型大鼠的卵巢结构功能变化,验证此种疗法的可行性及其可能的治疗机制,为 hUCMSCs 临床应用提供参考依据。

1　材料与方法

1.1　材料　SPF 级 SD 雌性大鼠 62 只,体质量(200±11)g,购自广东省医学实验动物中心。检疫 4 d 合格后进入实验,饲养温度与湿度:20～26 ℃,40%～70%,10 h∶14 h 昼夜间断照明,自由进食饮水。CTX 购自德国 Barter Oncology Gmbh。血清检测 ELISA 试剂盒购于南京建成生物。选择预产期前 1 个月内母血检测传染性病毒阴性者足月分娩胎儿的脐带作样本,与产妇签订知情同意书。组织贴壁法分离培养源细胞,后续试验均采用第 5 代 hUCMSCs。

1.2　方法

1.2.1　大鼠 POF 模型建立　雌性 SD 大鼠(n=62)随机数字表法分成阴性对照(A 组,n=18)、模型对照(B 组,n=22)和 hUCMSCs 移植组(C 组,n=22)。参照文献[6-7]实验,避免一次性大剂量注射 CTX 大鼠有致死风险,剂量不足可致造模失败,改进方案:B、C 组第 1 天、第 2～15 天分别注射 CTX 10.00、3.20 mg/mL(5 mL/kg,1 次/天,腹腔注射)[8]。A 组注射等体积灭菌水。B、C 组建模成功后各取 18 只大鼠用于后期实验。建模前及完成后 1 d 尾静脉采血测卵泡刺激素(FSH)、雌二醇(E2)水平。建模完成后 2 d 尾静脉移植生长良好的第 5 代 hUCMSCs 单细胞悬液1 mL(1×10^6/mL)至 C 组。A、B 均注射等量灭菌水。移植后 1、17 d 分组取血和卵巢组织测量各项指标。

1.2.2　观察指标

1.2.2.1　血清检测指标　CTX 建模前后检测血清中 E2 和 FSH 水平综合评估 POF 模型构建是否成功。hUCMSCs 移植后 1、17 d 取 3 组大鼠每组 6 只,腹主动脉采血,ELISA 检测血清中 FSH、黄体生成素(LH)、抑制素 B(INHB)和抗苗勒管激素(AMH),对比 FSH/LH 值。

1.2.2.2　HE 染色　hUCMSCs 移植后 1、17 d 取大鼠(每组 6 只)卵巢 HE 染色切片观察组织形态,计算卵巢中生长卵泡、闭锁卵泡与黄体数。

1.2.2.3　荧光标记原位杂交技术(FISH)检测 ALU 基因表达　hUCMSCs 移植后 17 d 用 FISH 检测大鼠(每组 6 只)卵巢中是否表达人的特异性基因序列 ALU,通过设计 ALU 特异性探针,如果阳性则代表卵巢中存在人的细胞,证明移植的 hUCMSCs 存在于大鼠卵巢,取乳腺癌组织为阳性对照。

1.2.2.4　免疫组织化学(IHC)检测天冬氨酸蛋白水解酶 3(caspase-3)　移植后 17 d 取大鼠卵巢组织切片,IHC 染色法处理,显微镜下随机选取 3 个 200 倍放大视野使用 IPP6.0 对含半胱氨酸的 caspase-3 信号进行光密度值半定量分析。组织学观察正常情况下只在闭锁卵泡的颗粒细胞和黄体中的黄体细胞和膜细胞阳性表达 caspase-3 信号,POF 患者除了在前 3 种细胞中表达外,生长卵泡和成熟卵泡的颗粒细胞中也呈阳性表达。

1.3　统计学处理　数据采用 SPSS23.0 进行分析,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组比较用单因素方差分析,两两比较用 LSD 法;两独立样本数据采用 t 检验,检验标准 α=0.05,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2　结　　果

2.1　各组大鼠血清 E2、FSH 水平比较　建模前 1 d A、B、C 3 组大鼠血清 E2、FSH 水平比较,差异均无统计学意义(P>0.05)。建模后 1 d,B、C 组 E2 水平均低于 A 组,FSH 水平均高于 A 组,差异均有统计意义(P<0.05),而 B、C 组间 E2、FSH 水平比较,差异均无统计学意义(P>0.05),见表 1。

表 1　建模前后大鼠血清 E2、FSH 水平比较($\bar{x}\pm s$,n=18)

组别	E2(ng/L)		FSH(mU/mL)	
	建模前 1 d	建模后 1 d	建模前 1 d	建模后 1 d
A 组	71.04±10.60	71.15±9.54	4.24±0.33	4.18±0.54
B 组	72.25±8.60	59.40±5.61[a]	4.17±0.47	5.28±0.54[a]
C 组	70.70±8.61	63.96±8.95[a]	4.18±0.43	5.38±0.60[a]

[a]:P<0.05,与 A 组比较

2.2　各组大鼠卵巢储备功能比较　3 组大鼠移植后 1、17 d,FSH/LH 比值比较,差异均无统计学意义(P>0.05)。移植后 1 d,B、C 组 INHB、AMH 水平均低于 A 组(P<0.05);B、C 组间差异无统计学意义(P>0.05)。移植后 17 d,C 组相较 B 组 INHB 水平增加(P<0.05),但仍低于 A 组(P<0.05);AMH 水平较 B 组增加,与 A 组比较差异无统计学意义(P>0.05),见表 2。

2.3　各组大鼠卵巢组织 HE 染色结果比较　各组大鼠卵巢组织结构完好,可见各级卵泡及黄体。A 组大鼠卵巢组织结构未见异常,闭锁卵泡数量较少;B 组大鼠较 A 组卵巢体积减小、生长卵泡减少、闭锁卵泡增加,差异均有统计学意义(P<0.05);C 组大鼠较 B 组生长卵泡增多、闭锁卵泡减少,差异均有统计学意义(P<0.05)。各组大鼠两个时间点黄体数量均未见明显变化(P>0.05)。各组大鼠移植后 1、17 d 卵巢组织 HE 染色结果,见图 1、表 3。

2.4　hUCMSCs 移植后 17 d 卵巢中人 ALU 基因表达情况　DAPI 染色阳性对照细胞核呈蓝色,图中被染成红色的即为人 ALU 基因序列探针。取 A 组卵巢组织为阴性对照,观察发现被染成蓝色的细胞核,并无红色斑点存在。移植 hUCMSCs 后 1、17 d 卵巢组织中均能观察到被染成红色的人 ALU 基因,且能在少量的颗粒细胞及卵子细胞中观察到被染成红色的人 ALU 基因,见图 2。

2.5 各组大鼠 caspase-3 水平比较 光密度值半定量分析，移植后 1、17 d caspase-3 免疫组织化学结果均显示 C 组信号表达量高于 B 组，B 组信号表达量高于 A 组，差异均有统计学意义（$P<0.05$）。组织学观察，发现 caspase-3 信号在 A、C 组中表达在闭锁卵泡的颗粒细胞和黄体中的黄体细胞和膜细胞，生长卵泡和成熟卵泡的颗粒细胞不表达；caspase-3 信号在 B 组的闭锁卵泡的颗粒细胞、黄体中的黄体细胞和膜细胞，以及生长卵泡和成熟卵泡的颗粒细胞中均表达，见图 3、表 4。

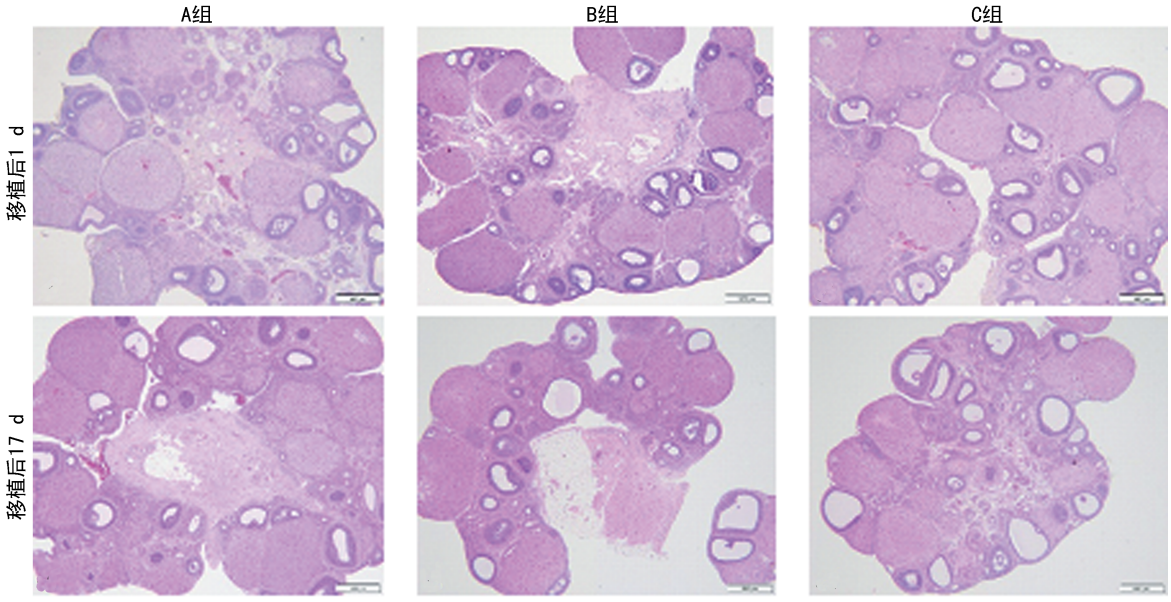
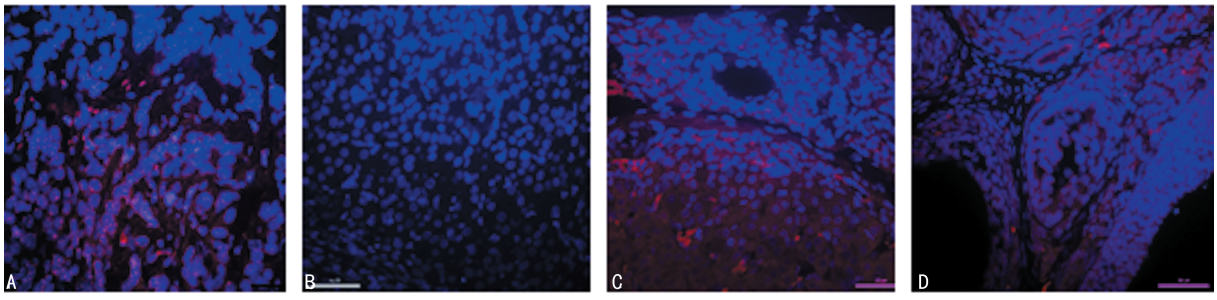


图 1 3 组大鼠移植后卵巢 HE 染色结果（HE，×40）



A：阳性对照；B：阴性对照；C：hUCMSCs 移植 1 d；D：hUCMSCs 移植 17 d

图 2 FISH 检测 hUCMSCs 移植后大鼠卵巢中人 ALU 基因表达

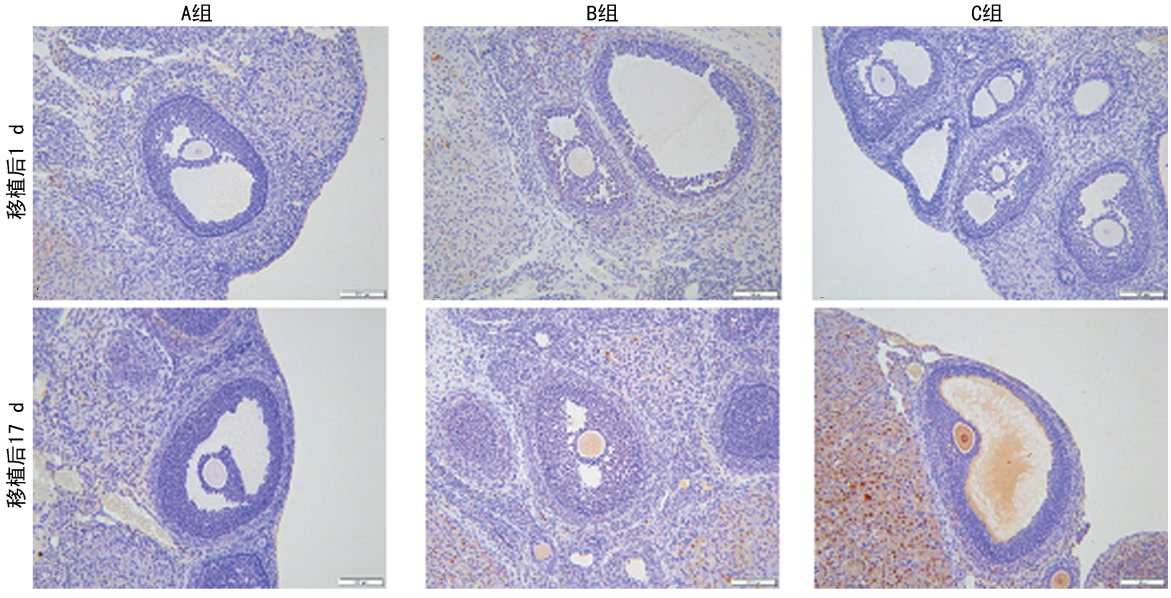


图 3 caspase-3 信号在 3 组大鼠卵巢组织中表达情况（HE，×200）

表 2　3 组大鼠移植后卵巢储备功能评价指标比较($\bar{x}\pm s$,$n=6$)

组别	FSH/LH		INHB(pg/mL)		AMH(ng/mL)	
	移植后 1 d	移植后 17 d	移植后 1 d	移植后 17 d	移植后 1 d	移植后 17 d
A 组	1.56±0.35	1.39±0.27	147.76±19.51	144.39±8.58	1.80±0.16	1.88±0.16
B 组	1.59±0.51	1.59±0.51	119.38±14.69[a]	117.27±14.69[a]	1.48±0.59[a]	1.51±0.28[a]
C 组	1.56±0.37	1.56±0.35	123.47±12.74[a]	139.10±16.48[ab]	1.50±0.14[a]	1.68±0.19

[a]:$P<0.05$,与 A 组比较;[b]:$P<0.05$,与 B 组比较

表 3　3 组大鼠移植后卵泡计数比较($\bar{x}\pm s$,$n=6$)

组别	生长卵泡		闭锁卵泡		黄体	
	移植后 1 d	移植后 17 d	移植后 1 d	移植后 17 d	移植后 1 d	移植后 17 d
A 组	42.71±13.62	32.23±6.84	14.20±3.13	9.24±2.91	15.54±2.70	15.30±2.43
B 组	24.33±10.10[a]	19.80±6.71[a]	32.83±5.31[a]	19.20±5.12[a]	16.53±2.91	14.00±3.91
C 组	39.00±11.21[b]	28.75±2.63[b]	17.32±6.40[b]	11.73±1.60[b]	14.81±4.72	11.32±1.23

[a]:$P<0.05$,与 A 组比较;[b]:$P<0.05$,与 B 组比较

表 4　caspase-3 IHC 分析结果($\bar{x}\pm s$,$n=6$,$\times10^{-3}$)

组别	移植后 1 d 卵泡	移植后 17 d 卵泡
A 组	2.27±0.97	4.23±1.84
B 组	6.91±2.23[a]	9.23±3.63[a]
C 组	3.58±1.17[b]	4.40±1.46[b]

[a]:$P<0.05$,与 A 组比较;[b]:$P<0.05$,与 B 组比较

3　讨　论

MSC 起源于中胚层,具有自我复制和多向分化潜能。近年来,大量研究表明,MSC 具备机体损伤及免疫调节的功能,被广泛地应用于心血管、血液和神经系统等多方面疾病的临床前研究中。来源于新生儿组织(脐带血)的多功能 MSC 是再生医学中极有潜力的干细胞群体[9],本研究结果表明,hUCMSCs 移植治疗后大鼠与未治疗大鼠相比,颗粒细胞细胞核膜逐渐修复,核仁出现,内质网与线粒体少量存在,说明 hUCMSCs 对卵巢颗粒细胞有修复作用。同时,光密度值半定量分析法检测到,C 组治疗后大鼠卵泡中 caspase-3 的信号表达低于 B 组,且在生长卵泡和成熟卵泡中检测不到 caspase-3 信号,说明 hUCMSCs 可以减少生长卵泡凋亡。因此,本实验为 hUCMSCs 治疗 POF 提供了实验室依据,运用 hUCMSCs 治疗 POF 大鼠具有可行性,其可改善卵巢储备功能。

CTX 会造成颗粒细胞的损伤[10],颗粒细胞是包绕在卵母细胞周围的一层菱形或扁平细胞,在卵母细胞发育成熟过程中起信号传导与营养支撑作用,对维持卵泡正常功能极为重要。研究发现 B 组大鼠颗粒细胞核溶解、核膜消失、线粒体空泡化,线粒体与内质网数量逐渐减少,对比 hUCMSCs 移植治疗后大鼠,证明了 hUCMSCs 对卵巢颗粒细胞的修复作用。可以推测 hUCMSCs 是通过修复卵巢颗粒细胞、减少生长卵泡凋亡而达到修复受损卵巢的作用。人鼠之间存在较大种族差异,但人与人之间不存在此种隔阂,使用人胚胎来源的 hUCMSCs 来治疗人类 POF,临床实施可行性大大提高[11]。

朱少芳[12]将 hUCMSCs 移植进 POF 小鼠体内,在卵巢中发现了供体来源的卵母细胞,小鼠生殖能力得到改善,认为 MSC 有向受损部位浓集并分化成卵母细胞进行卵巢修复的特性[13]。本研究用 FISH 检测法观察到卵巢间质、颗粒和卵子细胞中均存在少量人 ALU 基因,证明 hUCMSCs 在卵巢间质中有分布,且有少量分化成了颗粒和卵子细胞。这说明通过尾静脉注射 hUCMSCs 可成功到达卵巢,与李彩霞等[14]发现 BMSCs 定向卵巢部位归巢能力的结果一致,其且与 BMSCs 有相同特性,可改善大鼠生殖能力,论证了静脉注射移植 hUCMSCs 的可行性。此外,静脉注射创伤性远小于卵巢原位注射,操作可行性高,也为 hUCMSCs 运用于临床治疗 POF 奠定了基础。

本实验选用 FSH/LH、INHB、AMH 3 个临床上较优的评价指标[15]。结果发现 POF 大鼠移植 hUCMSCs 后 17 d,血清中 AMH、INHB 水平均上升,足以说明 hUCMSCs 可以有效地改善卵巢储备功能。这对改善临床上 POF 患者不孕状况,具有十分重要的意义。hUCMSCs 治疗 POF 有两个可能的途径:(1)通过修复颗粒细胞等功能型细胞来修复受损卵巢;(2)直接分化成卵巢内颗粒细胞和卵子细胞对卵巢进行修复。hUCMSCs 在 POF 相关疾病中的研究成果大多局限于动物模型,实际应用于临床仍需继续探索。此外,POF 产生机制尚不完全清楚,今后应开展更多、更全面的深入研究,为 POF 的治疗提供一个新的可行途径。

参考文献

[1]　廖文娟,李田,李小毛.间充质干细胞在女性不孕症相关

疾病中的基础研究进展[J]. 新医学,2017,48(8):524-527.

[2] BADAWY A,SOBH M A,AHDY M,et al. Bone marrow mesenchymal stem cell repair of cyclophosphamide-induced ovarian insufficiency in a mouse model[J]. Int J Womens Health,2017(9):441-447.

[3] 冯春,冯磊,梁素丽,等. 人脐带间充质干细胞的生物学特征及在妇产科中的研究进展[J]. 医学综述,2015,21(12):2133-2136.

[4] SONG D,ZHONG Y,QIAN C,et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells therapy in cyclophosphamide-induced premature ovarian failure rat model[J]. Biomed Res Int,2016,2016(6):1-13.

[5] 李慧,张琛,崔恒,等. 人脐带间充质干细胞治疗早发性卵巢功能不全的研究进展[J]. 中国妇产科临床杂志,2017,18(5):478-480.

[6] 吕晓丹. 脐带间充质干细胞移植治疗卵巢早衰的实验研究[D]. 北京:北京协和医学院,2016.

[7] 赵雪静. 促性腺激素释放激素拮抗剂(GnRHant)预防化疗损伤性卵巢功能早衰的实验研究[D]. 西安:第四军医大学,2011.

[8] 王婷. 人脐带间充质干细胞治疗卵巢早衰的实验研究[D]. 广州:广东药科大学,2017.

[9] HASS R,KASPER C,BOHM S,et al. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC):a comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC[J]. Cell Commun Signal,2011,9(1):12-15.

[10] 杜静,刘文慧,王婷,等. 人脐带间充质干细胞对卵巢早衰大鼠卵巢超微结构和功能的影响[J]. 现代妇产科进展,2018,27(2):127-130.

[11] WANG F,WEI Z L,SUN X R,et al. Apoptosis inducing factor is involved in stretch-induced apoptosis of myoblast via a caspase-9 independent pathway[J]. J Cell Biochem,2017,118(4):829-838.

[12] 朱少芳. 人脐带间充质干细胞移植改善化疗损伤卵巢功能的实验研究[D]. 广州:南方医科大学,2011.

[13] ZHU S F,HU H B,XU H Y,et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation restores damaged ovaries[J]. J Cell Mol Med,2015,19(9):2108-2117.

[14] 李彩霞,王凤英,李玉艳,等. 小鼠卵巢早衰动物模型的构建[J]. 第三军医大学学报,2008,30(6):506-509.

[15] YANG N,QIN X,PENGLI X U,et al. The value of AMH and INHB in prediction of ovarian reserve function in ovarian benign tumor[J]. Lab Med Clin,2017,14(21):3178-3179,3182.

(收稿日期:2018-03-18 修回日期:2018-06-16)

(上接第 3967 页)

SAN A,et al. High levels of oxidative stress globally inhibit gene transcription and histone acetylation[J]. DNA Cell Biol,2006,25(2):124-134.

[4] SWYGERT S G,PETERSON C L. Chromatin dynamics:interplay between remodeling enzymes and histone modifications[J]. Biochim Biophys Acta,2014,1839(8):728-736.

[5] KONG X X,WANG R,LIU X J,et al. Function of SIRT1 in physiology[J]. Biochemistry(Mosc),2009,74(7):703-708.

[6] DI VINCENZO S,HEIJINK I H,NOORDHOEK J A,et al. SIRT1/FoxO3 axis alteration leads to aberrant immune responses in bronchial epithelial cells[J]. J Cell Mol Med,2018,22(4):2272-2282.

[7] RADA P,PARDO V,MOBASHER M A,et al. SIRT1 controls acetaminophen hepatotoxicity by modulating inflammation and oxidative stress[J]. Antioxid Redox Signal,2018,28(13):1187-1208.

[8] NAKAMURA K,KAGEYAMA S,KE B,et al. Sirtuin 1 attenuates inflammation and hepatocellular damage in liver transplant ischemia/Reperfusion:from mouse to human[J]. Liver Transpl,2017,23(10):1282-1293.

[9] SHEN Z,AJMO J M,ROGERS C Q,et al. Role of SIRT1 in regulation of LPS- or two ethanol metabolites-induced TNF-αlpha production in cultured macrophage cell lines[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol,2009,296(5):G1047-1053.

[10] WANG Y,JIANG Y M,FAN X M,et al. Hepato-protective effect of resveratrol against acetaminophen-induced liver injury is associated with inhibition of CYP-mediated bioactivation and regulation of SIRT1-p53 signaling pathways[J]. Toxicol Lett,2015,236(2):82-89.

[11] YIN H Q,HU M,LIANG X M,et al. Deletion of SIRT1 from hepatocytes in mice disrupts lipin-1 signaling and aggravates alcoholic fatty liver[J]. Gastroenterology,2014,146(3):801-811.

[12] LAN W W,PETZNICK A,HERYATI S,et al. Nuclear Factor-κB:central regulator in ocular surface inflammation and diseases[J]. Ocul Surf,2012,10(3):137-148.

[13] JIN F,CHENG D,TAO J Y,et al. Anti-inflammatory and anti-oxidative effects of corilagin in a rat model of acute cholestasis[J]. BMC Gastroenterol,2013,13(1):1-10.

[14] 史哲. 一线抗结核药物诱导小鼠肝损伤对肝细胞 NF-κB 表达的影响[D]. 唐山:华北理工大学,2015.

[15] YEUNG F,HOBERG J E,RAMSEY C S,et al. Modulation of NF-κB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase[J]. EMBO J,2004,23(12):2369-2380.

[16] WANG R H,ZHAO T R,CUI K R,et al. Negative reciprocal regulation between Sirt1 and Per2 modulates the circadian clock and aging[J]. Sci Rep,2016,6(6):28633-28648.

(收稿日期:2018-01-18 修回日期:2018-06-12)